

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jaroslava Zíková

Překryvy regulonů faktorů sigma RNA polymerázy u *Corynebacterium*
glutamicum

Overlaps of sigma factors regulons of RNA polymerase in *Corynebacterium*
glutamicum

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Miroslav Pátek, Csc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21.12.2020

Podpis.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. M. Pátkovi, CSc., za jeho odborné vedení, cenné rady, vstřícný přístup a trpělivost během psaní této bakalářské práce. Také děkuji své rodině za velkou podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Faktor sigma (σ) je součástí enzymového komplexu RNA polymerázy. Tento komplex (označovaný jako holoenzym) zajišťuje rozeznání konvenční (*consensus*) sekvence promotorů jednotlivých genů a iniciaci transkripce. U bakterie *Corynebacterium glutamicum* bylo nalezeno sedm faktorů. Genom této bakterie kóduje jeden primární faktor σ^A a dalších šest alternativních faktorů sigma: σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M . Tyto alternativní faktory sigma se exprimují v reakci na změny vnitřního nebo vnějšího prostředí a zajišťují přizpůsobení bakterie růstovým podmínkám. Jsou také jedním z mnoha regulátorů exprese genů na úrovni transkripce. Ve specifických případech je regulace exprese genů způsobena alternativními faktory sigma, které rozeznávají příslušné duální (rozpoznávané alternativně dvěma faktory sigma) nebo překrývající se promotory. Tím se geny řízené těmito promotory dostávají do překrývajících se sigma regulonů.

Klíčová slova: *Corynebacterium glutamicum*, faktor sigma, RNA polymeráza, transkripce, promotor, regulony, RNA-seq, *in vitro* transkripce, *in vivo* dvouplazmidový test

Abstract

Sigma factor (σ) is a part of the RNA polymerase enzyme complex. This complex (referred to as a holoenzyme) ensures the recognition of the consensus promoter sequences of the individual genes and the initiation of transcription. Seven sigma factors were found in *Corynebacterium glutamicum*. The genome of this bacterium encodes one primary factor σ^A and another six alternative sigma factors: σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H and σ^M . These alternative sigma factors are expressed in response to changes in the internal and external environment and ensure the adaption of the bacterium to growth conditions. They are also one of many ways to regulate gene expression at the transcriptional level. In specific cases, the regulation of gene expression is caused by alternative sigma factors that recognize corresponding dual (recognized alternatively by two sigma factors) or overlapping promoters. Thus, the genes controlled by these promoters are classified into overlapping regulons.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*, sigma factor, RNA polymerase, transcription, promoter, regulons, RNA-seq, *in vitro* transcription, *in vivo* two-plasmid system

Obsah

1	Úvod.....	1
2	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	2
2.1	Charakteristika.....	2
2.2	Využití	2
3	Podjednotky sigma RNA polymerázy	3
3.1	Charakteristika.....	3
3.1.1	RNA polymeráza	4
3.2	Role faktorů sigma v bakteriální transkripci	4
3.3	Druhy faktorů sigma v bakteriích.....	5
3.3.1	Faktory typu σ^{70}	5
3.3.2	Faktor typu σ^{54}	6
4	Faktory sigma v <i>Corynebacterium glutamicum</i>	7
4.1	Faktor SigA.....	7
4.2	Faktor SigB.....	8
4.3	Faktor SigC.....	9
4.4	Faktor SigD.....	9
4.5	Faktor SigE	10
4.6	Faktor SigH.....	11
4.7	Faktor SigM.....	12
5	Překryvy regulonů sigma faktorů.....	13
5.1	Duální promotory genů.....	13
5.2	Překrývající se promotory genů.....	14
5.3	Metody analýzy promotorů a jejich vztahu k faktorům sigma.....	16
5.3.1	RNA-seq	17
5.3.2	<i>In vivo</i> dvouplazmidový test	17
5.3.3	<i>In vitro</i> transkripce	18

6	Závěr	20
7	Seznam zkratek	21
8	Seznam použité literatury.....	22

1 Úvod

Bakteriální RNA polymeráza je enzymový komplex, který slouží k přepisu vlákna DNA do vlákna mRNA. Holoenzym této polymerázy je složen z pěti podjednotek ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) a disociovatelné podjednotky (faktoru) sigma (σ). Faktor sigma je důležitý pro iniciaci transkripce, protože rozeznává specifické promotorové sekvence. V bakteriích se vyskytují faktory sigma dvou typů, σ^{70} a σ^{54} . Primární faktor sigma, σ^{70} , je u *Escherichia coli* zodpovědný hlavně za přepis základních, esenciálních genů, které se exprimují v exponenciální fázi růstu. Na základě přítomnosti domén byly všechny příbuzné faktory typu σ^{70} rozřazeny do několika skupin. Druhý typ faktoru sigma, faktor σ^{54} , je méně častý a vyskytuje se v bakteriích jako alternativní faktor sigma. Alternativní faktory sigma mají bakterie k aktivaci exprese genů, které jsou nezbytné pro přežití bakteriální buňky při náhlé změně podmínek v jejím životním prostředí. Využívání funkce alternativních sigma podjednotek RNA polymerázy je jednou z možností bakterií, jak ovlivňovat transkripci a regulovat tedy expresi genů.

U *Corynebacterium glutamicum* bylo objeveno sedm faktorů sigma typu σ^{70} , z toho jeden primární faktor, σ^A , a dalších šest alternativních faktorů sigma. Produkty těchto genů se účastní procesů v buňce, které zajišťují reakci bakteriální buňky na změny pocházející z vnitřního nebo vnějšího prostředí.

2 *Corynebacterium glutamicum*

2.1 Charakteristika

Gram-pozitivní nesporulující bakterie *Corynebacterium glutamicum* patří mezi fakultativně aerobní organismy. Buňka *C. glutamicum* má tyčinkovitý tvar (Stackebrandt, Rainey and WardRainey, 1997). Bakterie se v přírodě vyskytuje zejména v půdě. Proto tyto mikroorganismy mají široké spektrum různých typů metabolismů. Geny jsou uloženy na jednom kruhovém chromozomu, který obsahuje 3,3 Mbp. V sekvenci chromozomu mírně převažují G+C páry (54,86 %) (Kalinowski *et al.*, 2003; Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013).

Tento bakteriální druh je zahrnut do kmene *Actinobacteria*, do řádu *Actinomycetales* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Do stejného řádu jsou řazeny také rody *Streptomyces*, *Rhodococcus* a *Mycobacterium*, které jsou také zkoumány pro použití v biotechnologickém průmyslu nebo pro medicínské účely. Do stejného kmene patří i bakterie, které se řadí mezi patogeny, například *Corynebacterium diphtheriae* a *Mycobacterium tuberculosis*. *C. glutamicum* není patogenní bakterie a nepotřebuje ke kultivaci speciální podmínky. Proto je obecně považována za GRAS (*Generally Recognized As Safe*) organismus (Eggeling and Bott, 2015). Díky svým vlastnostem je považována za vhodný modelový organismus pro studování biologie příbuzných druhů (Kalinowski *et al.*, 2003; Vertes, Inui and Yukawa, 2005; Wieschalka *et al.*, 2013; Eggeling and Bott, 2015).

Genom typového kmene *C. glutamicum*, ATCC 13032, který se nejčastěji využívá v biotechnologickém průmyslu, byl kompletně osekvenován, což pomohlo ověřit funkce některých dosud neznámých genů, určit biosyntetické dráhy a porozumět genové expresi (Kalinowski *et al.*, 2003).

2.2 Využití

Tento mikroorganismus je schopen exportovat velké množství kyseliny L-glutamové (Kinoshita *et al.*, 1957). V biotechnologickém průmyslu se proto používá k produkci L-glutamátu a L-lysinu (Hermann, 2003; Wendisch, Bott and Eikmanns, 2006).

Geny bakterie lze geneticky modifikovat a využít vyšlechtěné kmeny i k výrobě dalších aminokyselin, zejména k produkci L-serinu (Peters-Wendisch *et al.*, 2005), L-alaninu (Wieschalka, Blombach and Eikmanns, 2012), L-prolinu (Jensen and Wendisch, 2013), L-metioninu (Becker, Rohles and Wittmann, 2018), L-leucinu (Wang,

Xu and Zhang, 2019), L-izoleucinu, L-valinu a L-threoninu (Kalinowski *et al.*, 2003). L-threonin, spolu s L-lysinem a dalšími aminokyselinami se používají jako doplňkové látky v kuřecím, drůbežím a rybím krmivu. Dále L-lysin může být přeměněn na umělý biopolymer pro využití i v medicíně a ve farmaceutickém průmyslu (Shih, Shen and Van, 2006; Eggeling and Bott, 2015).

Dalšími biotechnologickými produkty vzniklými za použití *C. glutamicum* jsou například kadaverin (Kind *et al.*, 2010), vitamin pantothenát (vitamin B5) (Hüser *et al.*, 2005), polymery (Song *et al.*, 2012), ornitin (Schneider *et al.*, 2010), isobutanol (Smith, Cho and Liao, 2010), laktát (Inui *et al.*, 2004), sukcinát (Briki *et al.*, 2020), pyruvát (Wieschalka, Blombach and Eikmanns, 2012), či glutamináza, která deaminuje proteiny a degraduje nerozpustné pšeničné lepky (Yamaguchi, Jeenes and Archer, 2001). *C. glutamicum* snadno produkuje tento enzym do média, což může být využito v potravinářském průmyslu (Meissner *et al.*, 2007). Původně byla glutamináza objevena v médiu gram-negativní bakterie *Chryseobacterium proteolyticum* (Yamaguchi and Yokoe, 2000). V tomto případě však množství syntetizovaného enzymu nebylo dostačující k průmyslové výrobě (Kikuchi *et al.*, 2008). Pro farmaceutický průmysl by mohla být zajímavá i produkce lidského epidermálního růstového faktoru (hEGF), který *C. glutamicum* účinně secernuje do média v aktivní formě (Date *et al.*, 2006).

Pomocí metod genetického inženýrství lze připravovat různé produkční kmeny korynebakterií, což může mít velmi široké spektrum uplatnění při výrobě potravin, krmiv i kosmetiky, dále ve farmaceutickém průmyslu nebo v chemických syntézách. Proto je bakterie *C. glutamicum* v laboratořích stále zkoumána. Výzkum bakterie není omezen jen na využití v biotechnologii. Představuje ideální model pro práci v laboratoři, protože se snadno kultivuje a geneticky modifikuje (Vertes, Inui and Yukawa, 2005; Eggeling and Bott, 2015).

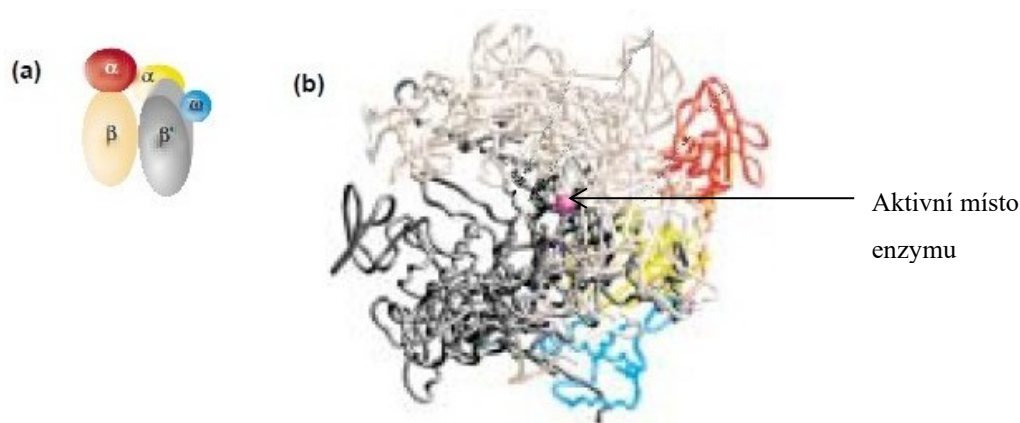
3 Podjednotky sigma RNA polymerázy

3.1 Charakteristika

DNA-dependentní RNA polymeráza (RNAP) je klíčový enzym pro transkripci genů, a tedy pro první stupeň jejich exprese. Podjednotky sigma neboli faktory sigma jsou proteiny, které jsou nezbytnou součástí enzymu RNA polymerázy. Jejich hlavním úkolem je specificky rozeznávat sekvenci promotoru a iniciovat transkripci DNA (Borukhov and Nudler, 2003; Kazmierczak, Wiedmann and Boor, 2005).

3.1.1 RNA polymeráza

Bakteriální RNAP je komplex složený z několika základních podjednotek: α_2 , β , β' a ω (obr. 1). Tyto podjednotky tvoří katalytické jádro o molekulové hmotnosti ~400 kDa (A Darst, 2001). Tento komplex společně s faktorem σ , který může volně disociovat, tvoří holoenzym. Holoenzym rozpoznává specifické sekvence promotorů v DNA. Dvě specifické sekvence se vyskytují v blízkosti pozic -35 a -10 od začátku transkripce, který se značí číslem +1. Dvouřetězcová DNA je vazbou enzymového komplexu rozvolněna a po vzniku transkripční bubliny začíná RNAP transkribovat DNA do RNA. (Murakami, Masuda and Darst, 2002).



Obr. 1: Katalytické jádro bakteriální RNA polymerázy. Tato polymeráza je složena ze dvou identických podjednotek α a dále podjednotek β , β' a ω . Na podjednotky β a β' se naváže faktor sigma. Vznikne holoenzym, který po rozpoznání sekvence promotoru zahájí transkripci. Odpovídající podjednotky jsou označeny stejnými barvami. a) schéma bakteriální RNAP, b) trojrozměrná struktura bakteriální RNAP, aktivní místo enzymu tvoří kovový ion (upraveno podle: Cramer, 2002).

3.2 Role faktorů sigma v bakteriální transkripci

Faktor sigma hraje v bakteriální transkripci velmi důležitou roli, zejména při rozpoznání specifických promotorů a následné iniciaci transkripce, která je jedním z regulačních stupňů genové exprese. Je totiž nezbytnou součástí RNAP (Murakami *et al.*, 2002). V různých kmenech bakterií se vyskytuje různý počet faktorů sigma, které iniciují transkripci specifických skupin genů (regulonů). Vždy se v bakteriální buňce vyskytuje jeden faktor sigma, který slouží pro přepis vegetativních genů a různý počet alternativních faktorů sigma. Alternativní faktory sigma umožňují bakteriím aktivaci exprese genů v reakci na vnější podmínky (zvláště různé typy stresů) nebo na podněty z vnitřního prostředí (Gruber and Gross, 2003).

3.3 Druhy faktorů sigma v bakteriích

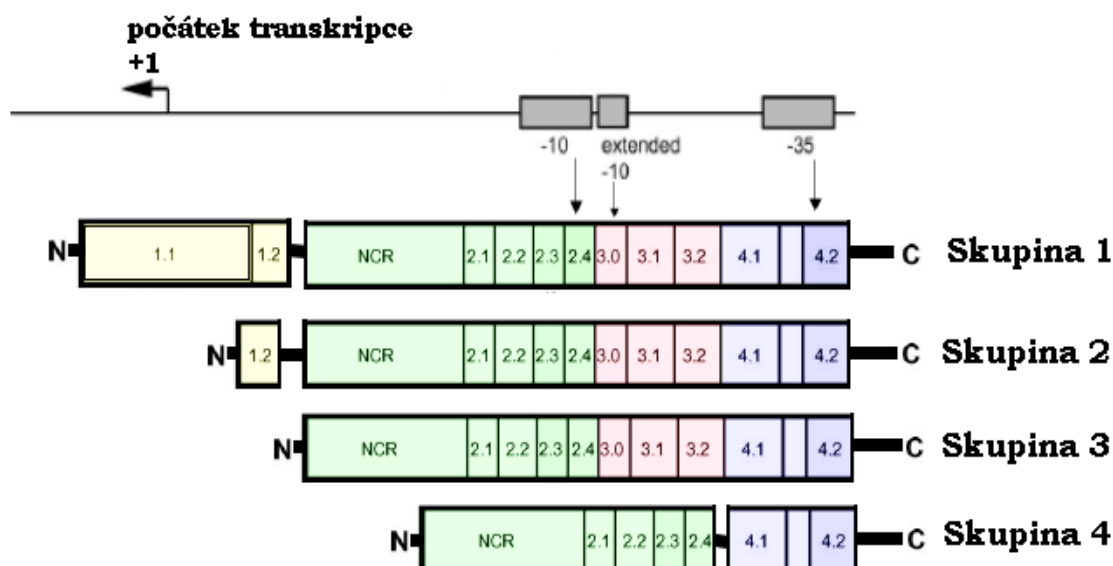
V bakteriálních buňkách se faktory sigma vyskytují ve dvou typech: σ^{70} a σ^{54} . Toto rozdělení je odvozené od modelového organismu *Escherichia coli*. Některé genomy bakterií zahrnují faktory σ^{70} i σ^{54} , zatímco jiné kódují jen faktory typu σ^{70} (Lonetto, Gribskov and Gross, 1992).

Všechny faktory sigma soutěží o stejnou molekulu RNA polymerázy v reakci na dané podmínky. Hladina jednotlivých faktorů sigma je regulována syntézou nebo degradací faktorů sigma či aktivací nebo deaktivací již existujících faktorů prostřednictvím anti-sigma faktorů (Gruber and Gross, 2003).

3.3.1 Faktory typu σ^{70}

Přítomnost těchto typů faktorů byla experimenty prokázána ve všech bakteriích, protože zajišťují transkripci vegetativních genů. Počet typů faktorů σ^{70} může být u různých kmenů bakterií velmi odlišný, od jediného typu u *Mycoplasma* sp. až po 60 typů faktorů σ^{70} u *Streptomyces coelicolor* (Gruber and Gross, 2003). Více faktorů sigma se obecně vyskytuje v těch mikroorganismech, které se setkávají s proměnlivým prostředím, a proto potřebují přizpůsobit svůj metabolismus daným změnám.

Faktory rodiny σ^{70} byly rozřazeny na základě sekvenční příbuznosti a počtu domén do několika skupin (Gruber and Gross, 2003) (obr. 2). Do skupiny 1 patří primární faktory sigma, které se vyskytují v každé bakterii. Faktory sigma z této skupiny zajišťují transkripci genů, které jsou nezbytné pro základní metabolismus dané bakterie. Faktory sigma skupiny 2 jsou velmi podobné faktorům sigma zařazených do skupiny 1. Tyto faktory sigma přepisují esenciální geny za stresových podmínek a geny ve stacionární fázi růstu. Faktory sigma skupiny 3 jsou nejvíce odlišné od faktorů sigma skupiny 1 a účastní se transkripce genů specifických regulonů. Tyto regulony zahrnují například geny pro sporulaci nebo pro syntézu bičíku (Gruber and Gross, 2003). Poslední skupina faktorů sigma, skupina 4, se účastní extracytoplazmatických funkcí (ECF), tedy převážně odpovídá na stresové podmínky a také regulace transportu (Lonetto, Gribskov and Gross, 1992; Gruber and Gross, 2003; Paget and Helmann, 2003).



Obr. 2: Schéma domén faktorů rodiny σ^{70} (dělení podle Gruber and Gross, 2003). Regiony a jejich podoblasti zprostředkovávají vazbu na RNAP a na vlákno DNA. Region 2.4 v oblasti 2 rozeznává element -10 promotoru. Region 2.3 je zapojen do tání dvouvláknové DNA a vytvoření transkripční bubliny. Region 3.0 v oblasti 3, pokud je přítomen, rozeznává rozšířenou oblast -10 promotoru. Druhý element promotoru, oblast -35 je rozpoznáván regionem 4.2 v oblasti 4. Region 1.1 v oblasti 1 se vyskytuje pouze u faktorů sigma skupiny 1. Funguje jako autoinhibiční doména, která zakrývá determinanty vazby DNA v systému σ^{70} . Zahnutá šipka označená +1 znázorňuje počátek transkripce (upraveno podle: Gruber and Gross, 2003; Rodrigue *et al.*, 2006).

3.3.2 Faktor typu σ^{54}

Řada druhů bakterií obsahuje i druhý typ faktoru sigma faktor σ^{54} (také nazýván σ^N). Tyto alternativní faktory sigma řídí specifické regulony aktivované během stresových podmínek. Dále se podílí na utilizaci různých látek jako zdroje dusíku a uhlíku, na chemotaxi, modifikaci RNA či na reakci na tepelný a fágový šok (Buck *et al.*, 2000).

Většina alternativních faktorů sigma je stavbou podobná faktoru σ^{70} , zatímco druhý typ, faktor σ^{54} , je zcela odlišný. Liší se v aminokyselinové sekvenci, struktuře a v transkripčním mechanismu (Lonetto, Gribskov and Gross, 1992; Gruber and Gross, 2003). Faktor σ^{54} vyžaduje jak speciální proteiny vázající *enhancer*, zesilovač, tak i ATP. Hydrolyza ATP je potřeba k aktivaci *enhanceru* a tím dojde ke zformování otevřeného komplexu, který umožňuje transkripci. Faktor σ^{54} má také schopnost měnit efektivitu transkripce na daném promotoru. Geny, které jsou přepsané tímto způsobem, jsou slabě či vysoce exprimovány v závislosti na fyziologických podmínkách či podmínkách okolního prostředí (Buck *et al.*, 2000).

4 Faktory sigma v *Corynebacterium glutamicum*

Chromozom *Corynebacterium glutamicum* obsahuje geny, které kódují 7 faktorů sigma typu σ^{70} : σ^A , σ^B , σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M . Každý z faktorů sigma rozpoznává určitou třídu promotorů. Příslušné geny jsou součástí genových skupin, regulonů (sigmulonů), a produkty těchto genů se účastní specifických funkcí buňky v reakci na změny pocházející z vnitřního nebo vnějšího prostředí (Pátek and Nešvera, 2011).

Faktor SigA (σ^A) je primární faktor sigma, který patří do skupiny 1 (Gruber and Gross, 2003). Tento faktor sigma iniciuje transkripci vegetativních genů (*housekeeping genes*) a je nezbytný pro růst bakteriálních buněk. Faktor σ^B je faktor sigma ze skupiny 2 a je v aminokyselinové sekvenci velmi podobný faktoru σ^A . Ostatní faktory sigma σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M jsou zařazeny do skupiny 4 (Ehira *et al.*, 2008). Od skupin faktorů sigma 1 a 2 se liší hlavně v aminokyselinové sekvenci nebo počtu domén (obr. 2). Tyto faktory mají extracytoplazmatickou funkci (ECF), která zaručuje obranu bakterie před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí (Gruber and Gross, 2003). Faktory sigma skupiny 3 se u *Corynebacterium glutamicum* nevyskytují. U této bakterie nebyly také nalezeny faktory sigma σ^{54} (Pátek and Nešvera, 2011).

4.1 Faktor SigA

Faktor sigma skupiny 1, σ^A , je hlavním, primárním faktorem sigma RNAP v bakterii *Corynebacterium glutamicum*. Jeho úkolem je rozpoznání promotorů vegetativních genů. Faktor σ^A jako součást RNAP holoenzymu rozeznává svými doménami 2.4 a 4.2 specifické sekvence promotorů na pozici -10 a -35 a následně iniciuje transkripci těchto genů (Gruber and Gross, 2003). Tyto geny jsou důležité pro chod základních metabolických procesů v bakteriální buňce (Larisch *et al.*, 2007; Ehira *et al.*, 2008).

Gen *sigA* je nejčastěji přepisován při exponenciální fázi růstu *C. glutamicum*. Při přechodu z exponenciální růstové fáze do stacionární fáze klesá množství exprese tohoto genu a naopak se zvyšuje exprese genů, které kódují alternativní faktory sigma, které iniciují transkripci genů ve stresových podmínkách, například při nedostatku živin nebo v reakci na změnu teploty okolního prostředí (Larisch *et al.*, 2007).

Promotory, které jsou rozeznávané faktorem σ^A , jsou označovány jako σ^A -dependentní promotory. Ne všechny σ^A -dependentní promotory jsou však rozpoznávané jen faktorem σ^A . Na některé z těchto promotorů se navazují i alternativní faktory sigma, většinou σ^B (Pátek and Nešvera, 2011).

σ^A -dependentní promotory jsou aktivní hlavně během exponenciální fáze růstu, kdy bakteriální kultura rychle roste. Tyto promotory se podílí na iniciaci transkripce vegetativních genů při standardních podmínkách a na transkripci alternativních faktorů sigma při změně podmínek (Dostálová *et al.*, 2015; Pátek and Nešvera, 2011).

Konvenční sekvence (*consensus sequence*) oblastí promotorů -10 a -35 u *C. glutamicum* byly nejdříve určeny pomocí analýzy, která byla nejprve provedena u modelového organismu *E. coli*. Na základě sekvenování velkého počtu definovaných promotorů byla odvozena také sekvence σ^A -dependentních promotorů u *C. glutamicum*. V oblasti promotoru -10 se rozpoznávací sekvence skládá z hexameru TANNNT a v oblasti promotoru -35 pak z hexameru TTGNCA (písmeno „N“ v sekvenci σ^A -dependentních promotorů znamená, že žádný nukleotid není v dané pozici konzervován). V oblastech sekvencí promotorů se velmi často vyskytují báze thymin a adenin. Tyto A+T bohaté sekvence umožňují rozvolnění dvouvlákna DNA a také ohyb DNA a tím se aktivují promotory (Pátek and Nešvera, 2011; Dostálová *et al.*, 2017).

Oblast promotoru -35 je u *C. glutamicum* méně konzervovaná než promotor -10. Je to způsobeno tím, že se vyskytuje mnoho promotorů s prodlouženým -10 promotorovým prvkem (TGNTATAAT). Toto prodloužení oblasti -10 promotoru zajišťuje specifickou funkci faktoru sigma v případech neoptimální sekvence oblasti -35 (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013).

4.2 Faktor SigB

Tento faktor sigma patří mezi σ^{70} skupiny 2 (Gruber and Gross, 2003). Strukturou je velmi podobný faktoru σ^A . Oba faktory sigma, σ^A a σ^B , rozeznávají téměř stejné promotorové sekvence, proto se faktor σ^B účastní i přepisu esenciálních genů (Larisch *et al.*, 2007). K tomuto přepisu dochází hlavně při nepříznivých environmentálních podmínkách, kdy je faktor σ^B více indukován. To umožňuje bakterii růst a přežít i v neoptimálním prostředí. S malou účinností pak faktor σ^B transkribuje vegetativní geny i za aerobních podmínek (Ehira *et al.*, 2008).

Faktor σ^B je kódován genem *sigB*. Tento gen je nejvíce přepisován RNAP za účasti faktoru σ^H (Ehira *et al.*, 2008) nebo faktoru σ^E (Pátek and Nešvera, 2011) při stresových situacích. Exprese tohoto genu je vyšší při přechodu z exponenciální fáze růstu do stacionární fáze růstu bakteriální buňky. A naopak při tomto ději klesá počet mRNA faktoru σ^A (Larisch *et al.*, 2007).

Faktor σ^B je dále indukován například při nedostatku kyslíku, kdy se podílí na pozitivní regulaci genů pro metabolismus glukózy. Touto pozitivní regulací se zvyšuje spotřeba glukózy a tak bakterie produkuje i více organických kyselin (Ehira *et al.*, 2008). Dále je tento faktor exprimován při stresových podmínkách, při kyselém stresu, ethanolovém šoku a v chladném prostředí (Halgasova *et al.*, 2001). Během přechodné fáze jsou přepisovány za účasti faktoru σ^B i geny, jejichž produkty se účastní metabolismu aminokyselin, metabolismu uhlíku, metabolismu fosforu, membránových procesů a obrany proti oxidačnímu stresu (Larisch *et al.*, 2007).

Promotory, které rozeznává faktor σ^B , se označují jako σ^B -dependentní. Třináct σ^B -dependentních promotorů bylo lokalizováno mapováním vysoce exprimovaných genů v přechodné fázi růstu. Sekvence promotoru -10 je stejná jako konvenční sekvence σ^A -dependentních promotorů. V oblasti -35 je naopak sekvence promotoru více různorodá, není tedy příliš konzervována (Ehira *et al.*, 2008; Pátek and Nešvera, 2011).

4.3 Faktor SigC

V *C. glutamicum* je tento alternativní faktor sigma syntetizován při stresových situacích, nejčastěji v reakci na množství kyslíku (Pátek and Nešvera, 2011). Bylo potvrzeno, že faktor σ^C reguluje expresi regulonů, které obsahují geny pro kódování respiračních enzymů, jako je například cytochrom aa3 (Toyoda and Inui, 2016). Faktor σ^C dále iniciuje transkripci genu *cg2556*, jehož produktem je železem regulovaný membránový protein (Dostálová *et al.*, 2017).

Pomocí analýzy bylo nalezeno osm σ^C -dependentních promotorů. Konvenční sekvence těchto promotorů v oblasti -10 je CGACTA a v oblasti -35 je GGGAAGT (Toyoda and Inui, 2016; Dostálová *et al.*, 2017).

4.4 Faktor SigD

Faktor σ^D je další alternativní faktor sigma, který je kódován bakteriálním genomem a přepisován pomocí primárního faktoru σ^A (Dostálová *et al.*, 2017). Sekvenováním transkriptomu bylo objeveno 29 genů, které jsou závislé na faktoru σ^D (Taniguchi *et al.*, 2017). Mezi σ^D -dependentní geny patří gen *rsdA*, který je umístěn v operonu za genem *sigD*. Proteinový produkt genu *rsdA* reguluje aktivitu faktoru sigma σ^D . Protein tedy funguje jako anti-sigma faktor (Dostálová *et al.*, 2015). Dále mezi σ^D -dependentní geny se řadí geny *cmt1*, *cmt2* a *cmt3*, které kódují enzymy syntézy kyseliny korynomykolové (Dostálová *et al.*, 2019; Dostálová *et al.*, 2017; Taniguchi *et*

al., 2017), gen *lppS* (pro tvorbu peptidoglykanu) nebo geny, které přispívají k odolnosti vůči lysozymu (Dostálová *et al.*, 2019; Toyoda and Inui, 2018). Tento faktor sigma se účastní také transkripce genů, které jsou důležité pro přizpůsobení bakterie při nedostatku kyslíku. Produkty těchto genů se podílí na buněčném dýchání nebo na metabolických reakcích, například ferredoxin a další proteiny, které usnadňují transport železa (Ikeda *et al.*, 2009).

Vyšší expresi některých σ^D -dependentních genů způsobuje přítomnost fenolu v kultivačním médiu, který působí jako stresový faktor. Fenol způsobuje rozvolnění složek buněčné stěny a zvýšení permeability buněk (Dostálová *et al.*, 2019).

Co se týče σ^D -dependentních promotorů, sekvenční motiv je v oblasti -10 CGAT a v oblasti -35 GTAACA/G. I přes odlišnosti v sekvenci promotorů jsou σ^D -dependentní promotory s nižší účinností rozpoznávány i faktorem σ^H (Dostálová *et al.*, 2019).

4.5 Faktor SigE

Zjistilo se, že tento alternativní faktor sigma umožňuje bakterii přizpůsobit se zvýšené koncentraci kyseliny mléčné (Jakob *et al.*, 2007), tepelnému, oxidačnímu a povrchovému stresu, který způsobuje poškození a degradaci proteinů (Park *et al.*, 2008; Pátek and Nešvera, 2011; Dostálová *et al.*, 2017). Za běžných podmínek je faktor σ^E syntetizován pouze v malém množství. Při teplotním šoku se však množství tohoto faktoru sigma v buňce výrazně zvýší (Park *et al.*, 2008).

Faktor σ^E se účastní transkripce genů kódujících transkripční regulátory (*clgR*) (Šilar *et al.*, 2016), proteázy (*clpB*) a chaperony (*dnaK* a *dnaJ2*), které se následně podílí na odpovědi na stres. Tyto geny jsou také aktivovány i faktorem σ^H v reakci na tepelný a oxidační stres (Dostálová *et al.*, 2019). Stejně překrytí funkcí σ^E a σ^H bylo objeveno u iniciace transkripce genu *sigB*, který kóduje faktor σ^B . Toto zjištění vychází z výsledků pokusů, kde zvýšená syntéza faktorů σ^E a σ^H vedla ke zvýšení exprese genu *sigB* (Dostálová *et al.*, 2017). U bakterie, které chyběl gen *sigE* bylo prokázáno, že vykazuje zvýšenou citlivost na nízkou koncentraci hořčičku i na SDS, lysozym, EDTA a teplo. Zřejmě funkce σ^E přispívá k adaptaci na tyto stresové faktory. Mezi další funkce tohoto faktoru sigma patří i odolnosti vůči antibiotikům, zejména na kyselinu nalidixovou, penicilin a vankomycin (Park *et al.*, 2008).

Podle dat z analýzy bylo objeveno, že gen *sigE*, který kóduje faktor sigma σ^E , je společně s genem *cseE* (kóduje CseE, anti-sigma faktor σ^E) v jedné transkripční jednotce, v operonu. Tento operon je transkribován faktorem σ^A z promotoru před genem *sigE*

a dále gen *cseE*, který je zařazen za genem *sigE* je přepisován také z vlastního promotoru za účasti σ^E nebo σ^H (Dostálová *et al.*, 2015). Anti-sigma faktor CseE funguje jako antagonist a po navázání na faktor σ^E jej inhibuje (Park *et al.*, 2008).

U *C. glutamicum* a u *M. tuberculosis* jsou sekvence σ^E -dependentních promotorů velmi obdobné. Jejich motivy jsou v oblasti -35 GGAAC a v oblasti -10 GTT (Rodrigue *et al.*, 2006). Motivы promotorů jsou téměř stejné jako u sekvencí σ^H - a σ^M -dependentních promotorů (Park *et al.*, 2008), a proto jsou i tyto σ^E -dependentní promotory často rozpoznávány faktorem σ^H , popř. σ^M .

4.6 Faktor SigH

Faktor σ^H patří u *C. glutamicum* mezi nejstudovanější faktory sigma typu ECF, skupiny 4 (Busche *et al.*, 2012; Dostálová *et al.*, 2019; Gruber and Gross, 2003). Jeho hlavní funkcí je adaptace na oxidační stres (T.-H. Kim *et al.*, 2005) a na stres způsobený teplem (Ehira *et al.*, 2009; Pátek and Nešvera, 2011). Po tepelném šoku vzroste aktivita promotoru *sigH*, proto se koncentrace faktoru σ^H výrazně zvýší (Pátek and Nešvera, 2011), a to má za následek zvýšenou syntézu proteinů tepelného šoku, chaperonů a proteáz (Ehira *et al.*, 2009).

Faktor σ^H se účastní transkripce genu *sigM* (Nakunst *et al.*, 2007), genu *sigA* a genu *sigB*. O promotor tohoto genu a o RNA polymerázu soutěží σ^H s faktorem σ^E (Ehira *et al.*, 2008; Dostálová *et al.*, 2017). Regulon σ^H obsahuje geny pro regulátory odpovědi na tepelný šok, jako je například gen *clgR*, který je též závislý na faktoru σ^E (Engels *et al.*, 2004; Šilar *et al.*, 2016), gen *sufR* (Ehira *et al.*, 2009), gen *whcA* (Choi *et al.*, 2009), gen *whcE* (T. H. Kim *et al.*, 2005), gen *hspR* (Ehira *et al.*, 2009) nebo je zapojen do svojí vlastní regulace (T.-H. Kim *et al.*, 2005).

Gen *sigH* se nachází ve stejném operonu jako gen *rshA*, který kóduje anti-sigma faktor RshA. Tento anti-sigma faktor reguluje aktivitu faktoru σ^H na posttranskripční úrovni (Pátek and Nešvera, 2011). Gen *rshA* je přepisován za účasti faktoru σ^H , oproti genu *sigH*, který má před svojí sekvencí σ^A -dependentní promotor (Busche *et al.*, 2012; Dostálová *et al.*, 2015).

Podle výsledků analýz bylo nalezeno 45 genů, jejichž promotory jsou σ^H -dependentní. Byla také sestavena konvenční sekvence těchto promotorů, a to v oblasti -10 (C/TGTTGA) a v oblasti -35 (GGGAAT/G) (Dostálová *et al.*, 2019; Ehira *et al.*, 2009; Pátek and Nešvera, 2011).

4.7 Faktor SigM

Tento alternativní faktor sigma je poslední zástupce z faktorů sigma typu ECF (Gruber and Gross, 2003). Množství faktoru σ^M se v *C. glutamicum* zvyšuje, a to zejména při tepelném šoku nebo disulfidovém a peroxidovém stresu. Následně faktor σ^M iniciuje expresi genů, jejichž produkty se podílí na odpovědi na tyto změny (Nakunst *et al.*, 2007; Dostálová *et al.*, 2017). Geny *trx* kódující thioredoxin reduktázu a thioredoxiny, které mají opravnou funkci pro oxidované thiolové skupiny v proteinech, byly nejprve popsány jako σ^M -dependentní (Nakunst *et al.*, 2007). Další studie však ukázala, že promotor tohoto genu je závislý na faktoru σ^H (Busche *et al.*, 2012). Součástí σ^M -regulonů jsou *suf* operon (Pátek and Nešvera, 2011), geny *groES*, *groEL*, *clpB* (kódující potřebné chaperony) (Dostálová *et al.*, 2019; Nakunst *et al.*, 2007) nebo geny zapojené do odpovědi na tepelný šok (*hspR*, *dnaJ*, *dnaK*). Podle mikročipových analýz bylo objeveno 23 σ^M -dependentních genů (Nakunst *et al.*, 2007).

Promotory σ^M -dependentních genů obsahují hexamer -10 C/TGTTGA/G a hexamer -35 GGGAAT. Sekvence jsou odděleny 17-18 bp sekvencí (*spacer*). Konvenční sekvence hexamerů v *C. glutamicum* jsou téměř totožné s σ^H -dependentními promotory, tudíž σ^M a σ^H rozeznávají pravděpodobně stejné promotory. Za podmínek thioloxidačního stresu je promotor genu *sigM* σ^H -dependentní. Faktor sigma σ^M poté spouští transkripci svého vlastního genu a následně i transkripci σ^M -dependentních genů (Nakunst *et al.*, 2007).

Tab. 1. Přehled konvenčních sekvencí tříd promotorů podle přiřazení k faktoru sigma u bakterie *C. glutamicum*

Faktory sigma	Oblast -35 promotoru	Oblast -10 promotoru
SigA	TTGNCA	TGN TATAAT NG
SigB	CGGCAA	TGNGN TATAAT GG
SigC	G GGAA CT	C G ACTA
SigD	GTAA CA/G	C GAT
SigE	GGAAC	GTT
SigH	G GGAA T/G	C/T GTT GA
SigM	G GGAA T/G	C/T GTT GA/G

Tab. 1 Sekvence oblastí -10 a -35 u známých promotorů řízených faktory sigma. (Albersmeier *et al.*, 2017; Dostálová *et al.*, 2019; Dostálová *et al.*, 2017; Ehira *et al.*, 2009, 2008; Kalinowski *et al.*, 2003; Nakunst *et al.*, 2007; Pátek *et al.*, 2013; Pátek and Nešvera, 2011; Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013; Rodrigue *et al.*, 2006; Toyoda and Inui, 2016). V sekvenci promotorů závislých na faktoru σ^A a σ^B se opakuje v oblasti -10 stejný motiv, který je velmi konzervovaný.

Tento motiv promotoru je právě rozpoznáván faktory σ^A i σ^B a tím je zajištěna exprese vegetativních genů oběma faktory sigma. U ostatních, alternativních faktorů je konvenční sekvence rozeznávaných promotorů úplně odlišná od sekvence promotorů závislých na faktoru σ^A a σ^B , a proto dochází jen ojediněle k překryvu mezi těmito sigma faktory. Oproti tomu jsou překryvy regulonů častější mezi alternativními faktory sigma. Dokazují to i konvenční sekvence promotorů, které jsou dependentní na alternativních faktorech sigma. Tyto sekvence jsou totiž značně podobné, jak je barevně znázorněno v tabulce 1.

5 Překryvy regulonů sigma faktorů

Pro přizpůsobení bakterií na změny vnějšího a vnitřního prostředí jsou velmi důležité složité procesy řízení genové exprese (Dostálová *et al.*, 2019). Ve specifických případech může být jeden promotor alternativně rozeznáván dvěma faktory sigma, které následně iniciují transkripci. Tyto duální nebo překrývající se promotory jsou rozeznávány RNAP, na které je navázán faktor sigma, který holoenzymu uděluje různou selektivitu (Pátek and Nešvera, 2011). Další možností regulace exprese genu dvěma faktory sigma je přítomnost dvou a více nezávislých promotorů, z nich každý je rozeznáván jiným faktorem sigma. Tím se takové geny zařazují do dvou nebo více částečně se překrývajících regulonů.

Překryvy regulonů byly nejprve objeveny u bakterie *E. coli*. Zjistilo se, že transkripce mnoha genů je iniciována ze dvou nebo více promotorů, které jsou navíc oddělené nebo překrývající (Nonaka *et al.*, 2006; Wade *et al.*, 2006). Podobné typy promotorů byly také nalezeny u *C. glutamicum* (Pátek and Nešvera, 2011), kde existence těchto promotorů byla prokázána experimentálně.

5.1 Duální promotory genů

Dva různé promotory byly nalezeny u některých genů, které jsou přepisovány ve stresových podmínkách. Například tyto promotory byly detekovány u genů *clpP*, *clpC* a *clgR*. Transkripční regulátor ClgR ovlivňuje transkripci genů *clpP* a *clpC* kódujících podjednotky proteázy Clp, která kontroluje kvalitu bílkovin (Engels *et al.*, 2004). Transkripce těchto genů je iniciována při tepelném šoku. Při těchto podmínkách se potvrdilo, že sekvence promotorů je typická pro promotory, které jsou rozeznávány faktory sigma skupiny 4, označované také ECF (*extracytoplasmic function*). Promotor *P1clgR* je za silného tepelného stresu rozeznáván faktorem σ^H nebo σ^E . Druhý promotor genů *clpP* a *clpC* je naopak závislý na faktoru σ^A . V tomto případě se před geny vyskytuje

jak duální promotor, tak i další promotor, který je rozpoznáván jiným faktorem sigma (Engels *et al.*, 2004; Šilar *et al.*, 2016).

Duální promotory rozpoznávají i faktory σ^A a σ^B . σ^A je primární faktor sigma zodpovědný za iniciaci transkripce z promotorů vegetativních genů při exponenciální fázi růstu. Konvenční sekvence promotorů vegetativních genů, které jsou σ^A - a σ^B -dependentní, jsou prakticky nerozeznatelné (Tab. 1). σ^B je proto také považován za záložní faktor sigma pro přepis vegetativních genů při přechodu do stacionární fáze růstu (Ehira *et al.*, 2008). Jedním z důkazů je, že během přechodné fáze je exprese genu *sigB* vyšší a naopak množství σ^A klesá (Larisch *et al.*, 2007).

Těmito dvěma faktory sigma jsou rozpoznávány i promotory *Pper* a *Ppgo*. Například promotor *Ppgo* patří ke genu *pgo*, který kóduje pyruvát: chinon oxidoreduktázu. Promotor genu se skládá z konvenční sekvence hexamerů -35 GTGGCA a -10 CACAAT. Tuto sekvenci rozeznává hlavně faktor σ^B , protože gen *pgo* je silně exprimován ve stacionární fázi růstu (Šilar *et al.*, 2016). Po delecí genu *sigB*, který kóduje faktor σ^B , je zbytková aktivita promotoru *Ppgo* zajištěna faktorem σ^A (obr. 3), jak bylo zjištěno při experimentech. Mutanti, kterým byl odebrán gen *sigB*, nevykazovali žádný očividný rozdíl v rychlosti růstu či životaschopnosti (Schreiner *et al.*, 2006).

5.2 Překrývající se promotory genů

Pomocí transkripce *in vitro* bylo zjištěno, že duální promotory se vyskytují u genů *cg0607*, *cg2047* a *cmt2* (kódující enzymy syntézy kyseliny koronomykolové) (obr. 3). Při stresových podmínkách byly promotory *P1cg0607*, *P1cg2047* a *P1cmt2* aktivnější s faktory σ^H než s faktory σ^D . V tomto případě faktor σ^H zastupuje chybějící nebo poškozený faktor σ^D . Důvodem je zřejmě identická konvenční sekvence promotoru v oblasti -35 (tab. 1). Před těmito geny je i druhý promotor *P2*, který je zřejmě rozeznáván faktory σ^A a σ^B za optimálních podmínek (Dostálová *et al.*, 2019). Obdobně byly studovány i promotory genů *lpd* a *lppS* (zodpovědný za tvorbu peptidoglykanu), u kterých se také potvrdilo, že jsou závislé na faktorech σ^H , σ^D , σ^A a σ^B . Oproti promotorům genů *lpd*, *cg0607* jsou promotory genů *fadD2* a *rsdA* závislé jen na alternativních faktorech σ^H a σ^D (obr. 3). Faktor σ^D a faktor σ^H rozeznávají promotory *P1cg0607*, *P1fadD2* a *P1rsdA*. Druhý promotor vyskytující se před genem *fadD2*, *P2fadD2* je však závislý pouze na faktoru σ^H (Dostálová *et al.*, 2019).

Výsledky z dalších experimentů ukázaly, že při vyšší syntéze faktorů σ^H a σ^E byl více exprimován i samotný gen *sigB*. Z toho vyplývá, že před genem *sigB* se vyskytuje

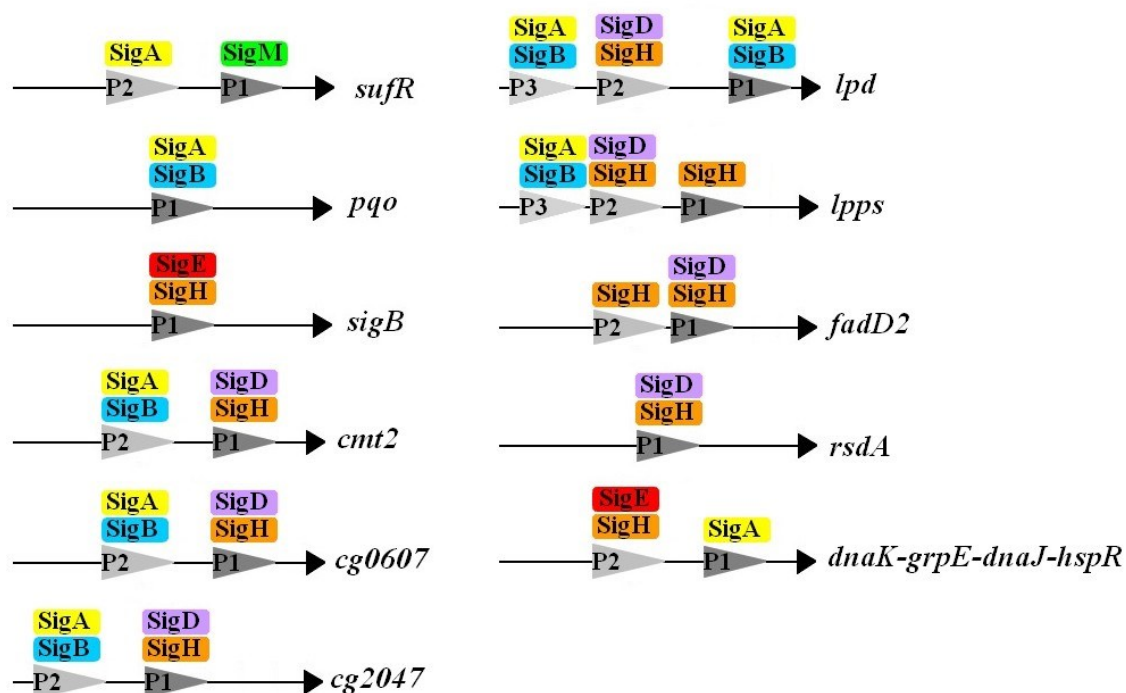
specifický promotor, který je rozpoznáván a regulován oběma faktory σ^H a σ^E (obr. 3) v závislosti na podmínkách (Ehira *et al.*, 2009; Dostálová *et al.*, 2017).

Dva překrývající se promotory byly lokalizovány u promotoru operonu chaperonů, *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, který je indukovaný tepelným šokem. Promotor P2*dnaK* je rozeznáván alternativě faktory σ^E a σ^H , zatímco promotor P1*dnaK* pravděpodobně primárním faktorem σ^A (obr. 3) (Pátek and Nešvera, 2011; Šilar *et al.*, 2016). Při experimentech, kde byly fragmenty genů *dnaK* a *dnaJ-hspR* použity jako hybridizační sondy, se objevily různě dlouhé transkripty mRNA, hlavní 4,7 kb odpovídá celému operonu *dnaK-grpE-dnaJ-hspR*, přepis 2,8 kb odpovídá genům *dnaK-grpE* a transkript 1,6 kb odpovídá *dnaJ-hspR* (Barreiro *et al.*, 2013; Barriuso-Iglesias *et al.*, 2013). Z toho je zřejmé, že tento operon *dnaK-grpE-dnaJ-hspR* obsahuje další dva interní promotory.

Různě dlouhé transkripty byly detekovány i u genu *gltA*, který je monocistronický a kóduje enzym citrát-syntázu. Northern blot analýzy genu *gltA* odhalily, že tento gen je exprimován do dvou odlišných mRNA. Iniciační místa transkripce jsou 121 bp a 357 bp proti směru transkripce (*upstream*) od translačního startovacího kodonu (van Ooyen *et al.*, 2011). Při kultivaci na acetátu vzniká kratší přepis genu, ale při růstu na glukóze převládá přepis delší. Příslušné promotory genu jsou pravděpodobně rozeznávány RNA polymerázou s navázaným faktorem σ^A a regulovány pomocí regulátorů (RamA, RamB a GlxR) (Pátek and Nešvera, 2011).

Ze čtyř σ^H promotorů jsou ko-transkribovány gen *sigH* a gen *rshA*, které jsou ve stejném operonu. Bylo objeveno, že promotor genu *rshA* je rozpoznáván faktorem σ^H , který následně řídí transkripci genu *rshA* (kóduje anti-sigma faktor). Oproti tomu před genem *sigH* se nacházejí promotory, které jsou rozeznávány při stresových stavech (teplotního a oxidativního stresu) faktorem σ^A (Busche *et al.*, 2012; Dostálová *et al.*, 2017).

Dalším příkladem genu, před kterým se nachází více promotorů, je gen *sufR*. Tento gen je součástí *suf* operonu kódující produkty, které jsou zodpovědné za tvorbu a opravu shluků železa a síry v proteinech při reakci na oxidační šok (Nakunst *et al.*, 2007). Použitím mutantu *C. glutamicum* s delecí genu *sigM* bylo objeveno, že promotor P1*sufR* je zřejmě závislý na faktoru σ^M , zatímco promotor P2*sufR* je pravděpodobně řízen faktorem σ^A (obr. 3) (Nakunst *et al.*, 2007; Pátek and Nešvera, 2011).



Obr. 3: Schéma duálních a násobných promotorů, které jsou *upstream* od počátku transkripce příslušného genu (upraveno podle Dostálová *et al.*, 2019). *Upstream* oblast obsahující promotory je znázorněna dlouhou černou šipkou. Špička šipky ukazuje začátek genu (iniciální kodon). Jednotlivé promotory jsou zobrazeny šedými šipkami. Nad těmito šipkami jsou znázorněny příslušné faktory sigma, které tyto promotory rozeznávají a regulují tak transkripci genů.

5.3 Metody analýzy promotorů a jejich vztahu k faktorům sigma

Studium duálních nebo násobných promotorů u *C. glutamicum* přispělo také k pochopení regulační sítě, která je řízena faktory sigma (Dostálová *et al.*, 2019). Výsledky naznačují, že překrývání regulonů faktorů sigma je běžný jev, který umožňuje buňkám *C. glutamicum* koordinovaně reagovat na stresy pocházející z vnitřního nebo z vnějšího prostředí (Šilar *et al.*, 2016).

Ke zkoumání vztahů faktor sigma-promotor na úrovni genomu a transkriptomu byla použita technika RNA-seq (sekvenování RNA). V kombinaci s analýzami jednotlivých promotorů technikami *in vitro* transkripce a *in vivo* dvouplazmidovým testem bylo pak dosaženo přesvědčivých výsledků (Dostálová *et al.*, 2019). Tyto metody byly použity ke klasifikaci promotorů a k určení, které faktory sigma rozpoznávají testované promotory a regulují tak iniciaci transkripce příslušných genů (Dostálová *et al.*, 2017). Tím byly geny také zařazeny do příslušných překrývajících se regulonů.

5.3.1 RNA-seq

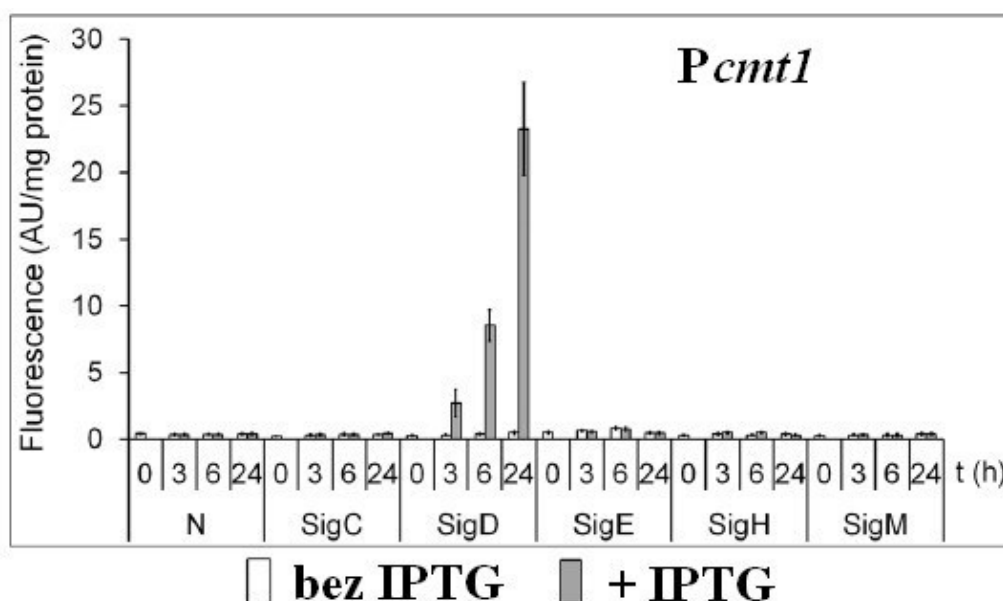
Tato technika byla využita na mapování počátků transkripce (TSS = *transcriptional start site*) genů, které jsou závislé na σ^D . Pomocí této metody bylo nalezeno u *C. glutamicum* 29 genů, které se silněji exprimovaly při zvýšené koncentraci σ^D . Pro další studium σ^D -dependentních genů a k mapování počátečních míst transkriptů byla využita RNA obohacená na 5'-konci transkriptu, a to zejména pro přesnější mapování TSS (Dostálová *et al.*, 2019). Díky této technice byla zjištěna promotorová sekvence genů, které jsou závislé na faktorech σ^D (Tab. 2)

Název genu	Sekvence promotoru	Vzdálenost TSS
<i>cmt1</i>	TG TTAACG TAATAG-CTTGAAATATA GAT GTAAATTAA A	173 nt
<i>lpd</i>	TG CTAACG GTTAGG-CACTATTTTCC GGT AGTTCTTTT G	360 nt
<i>cg0607</i>	AA GGAA CAATATCG-GTGTGATTCGC GAT ATATTAATC A	49 nt
<i>cmt3</i>	TT GTTACA AAACCATACGTCTGTGAA GAT ATGACG AGT G	44 nt
<i>lppS</i>	AC GTAACG CTCCGG-CATCTACAAGG GAT GATCAAAAT A	225 nt
<i>fadD2</i>	AA GTAATA AAAATGT-TCATCTTTGTC GAT GGTCACA ATA	30 nt

Tab. 2: Sekvence promotorových oblastí σ^D -dependentních genů (upraveno podle Dostálová *et al.*, 2019). Sekvence těchto promotorů byly stanoveny pomocí techniky RNA-seq. Oblasti promotoru -35 (GTAACA/G) a -10 (GAT) jsou v tabulce zvýrazněné žlutě. Prvky modře označené jsou motivy identické s konsensus sekvencemi σ^H -dependentních promotorů.

5.3.2 *In vivo* dvouplazmidový test

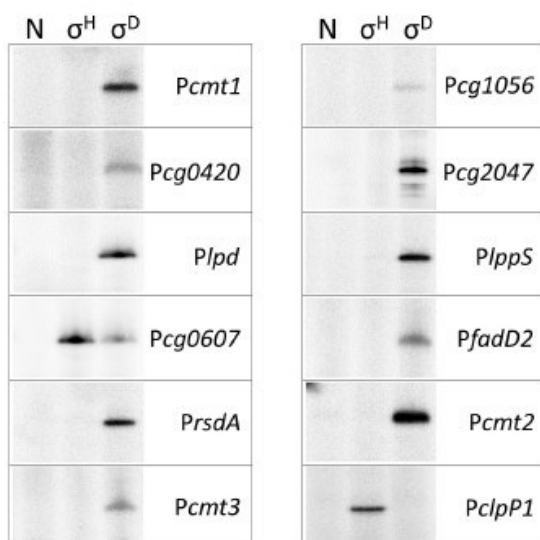
Tato metoda umožňuje *in vivo* identifikaci promotorů rozpoznávaných RNAP, která má navázaný konkrétní faktor sigma (obr. 5). Na tento druh testu se využívají kmeny *C. glutamicum*, ve kterých se replikují dva typy plazmidů. Tyto plazmidy se do buňky vnášejí postupnou transformací. Existence odpovídajících plazmidů je poté kontrolována pomocí PCR a analýzou restrikčními enzymy (Dostálová *et al.*, 2017). Podobná metoda byla nejprve použita při analýze vztahů promotorů a faktoru σ^E v *E. coli* (Rezuchova and Kormanec, 2001) a poté byla modifikována pro výzkum *C. glutamicum* (Dostálová *et al.*, 2017).



Obr. 5: Aktivita promotoru *Pcmt1* určená pomocí dvouplazmidového testu *in vivo* (upraveno podle Dostálová *et al.*, 2017). Aktivita promotoru byla stanovena měřením intenzity fluorescence reportéru Gfp. Dole jsou uvedeny faktory sigma, které byly použity pro zvýšenou expresi v buňce *C. glutamicum*. Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), který indukuje expresi jednotlivých *sig* genů v *C. glutamicum*, byl přidán v čase 0. AU–arbitrární jednotky. Výsledky v hodině 3, 6 a 24 jednoznačně ukazují, že *Pcmt1* je σ^D -dependentní.

5.3.3 *In vitro* transkripce

Pro tuto metodu je potřeba nejdříve izolovat z *C. glutamicum* jádro RNAP a faktory sigma. Smícháním RNAP a příslušného faktoru sigma (σ^C , σ^D , σ^E , σ^H a σ^M) se připraví holoenzym RNAP, který se přidá do transkripční směsi obsahující radioaktivně značené nukleotidy a templát (DNA nesoucí zkoumaný promotor) (Dostálová *et al.*, 2019). Tato transkripční směs se nechá inkubovat, aby proběhla transkripce. Vytvořené transkripty (radioaktivně značené) jsou separovány na gelové elektroforéze (polyakrylamid). Výsledky z elektroforézy jsou vizualizovány s použitím desky citlivé na radioaktivní záření (*screen*) a analyzovány pomocí softwaru (obr. 6) (Šilar *et al.*, 2016; Dostálová *et al.*, 2017).



Obr. 6: Výsledky metody *in vitro* transkripce (upraveno podle Dostálová *et al.*, 2019). Pomocí této metody bylo prokázáno, který faktor sigma rozpoznává promotor daného genu. Jak je znázorněno na obrázku, studované promotory jsou rozeznávány faktory σ^D , kdežto promotor P1 genu *clp*, který zde slouží jako kontrola, je rozpoznáván faktorem σ^H . Z výsledků je také patrné, že promotor genu *cg0607* (*Pcg0607*) je aktivní s faktory σ^H a σ^D , což je zřejmě způsobeno sekvencí v oblasti -35, která je shodná se sekvencí σ^H -dependentních promotorů (Busche *et al.*, 2012).

6 Závěr

C. glutamicum je gram-pozitivní nepatogenní bakterie, která je zařazena mezi GRAS organismy. Tento mikroorganismus je hlavně využíván v biotechnickém průmyslu, a to zejména k produkci aminokyselin. U této bakterie bylo nalezeno sedm sigma faktorů typu σ^{70} , které jsou součástí holoenzymu RNA polymerázy a iniciují tak transkripci genů. Esenciální geny jsou exprimovány pomocí faktoru σ^A během exponenciální fáze růstu. Při přechodu do stacionární fáze růstu nebo za specifických stresových podmínek se exprese genů účastní ostatní faktory sigma. Funkce těchto faktorů sigma a jejich vzájemné ovlivňování umožňuje regulaci transkripce a exprese genů, což vede k adaptaci bakterie na dané podmínky. Při studiu promotorů a faktorů byly popsány jednak konvenční sekvence promotorů, které jsou rozpoznávány příslušnými alternativními faktory sigma, jednak vlastnosti jednotlivých faktorů sigma. Navíc při těchto experimentech bylo zjištěno, že před určitými geny, které patří do společného regulonu, se vyskytují duální nebo násobné promotory. Tyto promotory jsou pak rozeznávány specifickými faktory sigma a ovlivňují tak transkripci příslušných genů, což je regulační strategie prokázaná také u jiných druhů bakterií. Tento způsob regulace je jedním z mnoha způsobů, jak se bakterie vyrovnávají s environmentálními stresy. Všechny tyto poznatky přispívají ke komplexnímu popisu exprese genů, fyziologie a metabolismu daného mikroorganismu. Shromážděné informace lze následně využít při dalších vědeckých experimentech nebo v biotechnologickém průmyslu.

7 Seznam zkratek

A - adenin

ATP - adenosintrifosfát

C - cytosin

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ECF - rodina sigma faktorů s extracytoplasmatickou funkcí (*extracytoplasmic function family sigma factors*)

G - guanin

GRAS - obecně uznávané jako bezpečné (*Generally Recognized As Safe*)

Mbp - mega páry bází (*mega base pair*)

mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina (*messenger ribonucleic acid*)

nt - nukleotid

RNAP - DNA-dependentní RNA polymeráza - RNA polymeráza

T – thymín

8 Seznam použité literatury

- A Darst, S. (2001) 'Bacterial RNA polymerase', *Current Opinion in Structural Biology*, 11(2), pp. 155–162.
- Albersmeier, A. *et al.* (2017) „Genome-Wide Determination of Transcription Start Sites Reveals New Insights into Promoter Structures in the Actinomycete *Corynebacterium Glutamicum*", *Journal of Biotechnology*, 257, pp. 99–109.
- Barreiro, C. *et al.* (2013) 'Transcriptional Analysis of the *groES-groEL1*, *groEL2*, and *dnaK* genes in *Corynebacterium glutamicum*: Characterization of Heat Shock-Induced Promoters (Retraction of vol 186, pg 4813, 2014)', *Journal of Bacteriology*, 195(11), pp. 2706–2706.
- Barriuso-Iglesias, M. *et al.* (2013) 'Transcriptional control of the F_0F_1 -ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: SigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values', *Microbial Biotechnology*, 6(2), pp. 178–188.
- Becker, J., Rohles, C. M. and Wittmann, C. (2018) 'Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products', *Metabolic Engineering*, 50, pp. 122–141.
- Borukhov, S. and Nudler, E. (2003) 'RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications', *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), pp. 93–100.
- Briki, A. *et al.* (2020) '*Corynebacterium glutamicum*, a natural overproducer of succinic acid?', *Engineering in Life Sciences*, 3(1), pp. 1–11.
- Buck, M. *et al.* (2000) 'The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^N) transcription factor', *Journal of Bacteriology*, 182(15), pp. 4129–4136.
- Busche, T. *et al.* (2012) 'Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*', *Bmc Genomics*, 13, p. 445.
- Choi, W.-W. *et al.* (2009) 'The *whcA* gene plays a negative role in oxidative stress response of *Corynebacterium glutamicum*', *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), pp. 32–38.
- Cramer, P. (2002) 'Multisubunit RNA polymerases', *Current Opinion in Structural Biology*, 12(1), pp. 89–97.
- Date, M. *et al.* (2006) 'Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*', *Letters in Applied Microbiology*, 42(1), pp. 66–70.
- Dostálová, H. *et al.* (2017) 'Assignment of sigma factors of RNA polymerase to promoters in *Corynebacterium glutamicum*', *AMB Express*, 7(1), p. 133.
- Dostálová, H. *et al.* (2019) 'Overlap of Promoter Recognition Specificity of Stress Response Sigma Factors SigD and SigH in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032', *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 3287.

Eggeling, L. and Bott, M. (2015) 'A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), pp. 3387–3394.

Ehira, S. *et al.* (2008) 'Group 2 sigma factor sigB of *Corynebacterium glutamicum* positively regulates glucose metabolism under conditions of oxygen deprivation', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), pp. 5146–5152.

Ehira, S. *et al.* (2009) 'Regulation of *Corynebacterium glutamicum* Heat Shock Response by the Extracytoplasmic-Function Sigma Factor SigH and Transcriptional Regulators HspR and HrcA', *Journal of Bacteriology*, 191(9), pp. 2964–2972.

Engels, S. *et al.* (2004) '*clpC* and *clpPIP2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor σ^H ', *Molecular Microbiology*, 52(1), pp. 285–302.

Gruber, T. M. and Gross, C. A. (2003) 'Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space', *Annual Review of Microbiology*, 57, pp. 441–466.

Halgasova, N. *et al.* (2001) 'Cloning and Transcriptional Characterization of Two Sigma Factor Genes, *sigA* and *sigB*, from *Brevibacterium flavum*', *Current Microbiology*, 43(4), pp. 249–254.

Hermann, T. (2003) 'Industrial production of amino acids by coryneform bacteria', *Journal of Biotechnology*, 104(1–3), pp. 155–172.

Hüser, A. T. *et al.* (2005) 'Rational design of a *Corynebacterium glutamicum* pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), pp. 3255–3268.

Ikeda, M. *et al.* (2009) 'Elucidation of Genes Relevant to the Microaerobic Growth of *Corynebacterium glutamicum*', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(12), pp. 2806–2808.

Inui, M. *et al.* (2004) 'Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions', *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7(4), pp. 182–196.

Jakob, K. *et al.* (2007) 'Gene Expression Analysis of *Corynebacterium glutamicum* Subjected to Long-Term Lactic Acid Adaptation', *Journal of Bacteriology*, 189(15), pp. 5582–5590.

Jensen, J. V. K. and Wendisch, V. F. (2013) 'Ornithine cyclodeaminase-based proline production by *Corynebacterium glutamicum*', *Microbial Cell Factories*, 12, p. 63.

Kalinowski, J. *et al.* (2003) 'The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins', *Journal of Biotechnology*, 104(1–3), pp. 5–25.

Kazmierczak, M. J., Wiedmann, M. and Boor, K. J. (2005) 'Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), pp. 527-543.

Kikuchi, Y. *et al.* (2008) 'Production of *Chryseobacterium proteolyticum* protein-glutaminase using the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(1), pp. 67-74.

Kim, T. H. *et al.* (2005) 'The *whcE* gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(3), pp. 757-764.

Kim, T.-H. *et al.* (2005) 'Functional analysis of *sigH* expression in *Corynebacterium glutamicum*', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(4), pp. 1542-1547.

Kind, S. *et al.* (2010) 'Systems-wide metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of diaminopentane', *Metabolic Engineering*, 12(4), pp. 341-351.

Kinoshita S., Udaka S., a Shimono M. (1957) „Studies on the Amino Acid Fermentation", *The Journal of General and Applied Microbiology*, 3, pp. 193-205.

Larisch, C. *et al.* (2007) 'The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase', *Bmc Genomics*, 8, p. 4.

Lonetto, M., Gribskov, M. and Gross, C. (1992) 'The σ^{70} Family - Sequence Conservation and Evolutionary Relationships', *Journal of Bacteriology*, 174(12), pp. 3843-3849.

Meissner, D. *et al.* (2007) 'Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), pp. 633-642.

Murakami, K. S., Masuda, S. and Darst, S. A. (2002) 'Structural Basis of Transcription Initiation: RNA Polymerase Holoenzyme at 4 Å Resolution', *Science*, 296(5571), pp. 1280-1284.

Nakunst, D. *et al.* (2007) 'The extracytoplasmic function-type sigma factor SigM of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is involved in transcription of disulfide stress-related genes', *Journal of Bacteriology*, 189(13), pp. 4696-4707.

Nonaka, G. *et al.* (2006) 'Regulon and promoter analysis of the E-coli heat-shock factor, σ^{32} , reveals a multifaceted cellular response to heat stress', *Genes & Development*, 20(13), pp. 1776-1789.

van Ooyen, J. *et al.* (2011) 'Citrate synthase in *Corynebacterium glutamicum* is encoded by two *gltA* transcripts which are controlled by RamA, RamB, and GlxR', *Journal of Biotechnology*, 154(2-3), pp. 140-148.

Paget, M. S. B. and Helmann, J. D. (2003) 'Protein family review - The σ^{70} family of sigma factors', *Genome Biology*, 4(1), p. 203.

- Park, S.-D. *et al.* (2008) ‘*Corynebacterium glutamicum* σ^E is involved in responses to cell surface stresses and its activity is controlled by the anti-sigma factor CseE’, *Microbiology-Sgm*, 154, pp. 915–923.
- Pátek, M. *et al.* (2003) ‘Promoters of *Corynebacterium glutamicum*’, *Journal of Biotechnology*, 104(1–3), pp. 311–323.
- Pátek, M. and Nešvera, J. (2011) ‘Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*’, *Journal of Biotechnology*, 154(2), pp. 101–113.
- Peters-Wendisch, P. *et al.* (2005) ‘Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production’, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), pp. 7139–7144.
- Pfeifer-Sancar, K. *et al.* (2013) ‘Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique’, *Bmc Genomics*, 14, p. 888.
- Rezuchova, B. and Kormanec, J. (2001) ‘A two-plasmid system for identification of promoters recognized by RNA polymerase containing extracytoplasmic stress response σ^E in *Escherichia coli*’, *Journal of Microbiological Methods*, 45(2), pp. 103–111.
- Rodrigue, S. *et al.* (2006) ‘The σ factors of *Mycobacterium tuberculosis*’, *Fems Microbiology Reviews*, 30(6), pp. 926–941.
- Schreiner, M. E. *et al.* (2006) ‘Pyruvate:Quinone Oxidoreductase in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular Analysis of the pqr Gene, Significance of the Enzyme, and Phylogenetic Aspects’, *Journal of Bacteriology*, 188(4), pp. 1341–1350.
- Shih, I.-L., Shen, M.-H. and Van, Y.-T. (2006) ‘Microbial synthesis of poly(ϵ -lysine) and its various applications’, *Bioresource Technology*, 97(9), pp. 1148–1159.
- Smith, K. M., Cho, K.-M. and Liao, J. C. (2010) ‘Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), pp. 1045–1055.
- Song, Y. *et al.* (2012) ‘Engineered *Corynebacterium glutamicum* as an endotoxin-free platform strain for lactate-based polyester production’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5), pp. 1917–1925.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. (1997) ‘Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov’, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), pp. 479–491.
- Šilar, R. *et al.* (2016) ‘Use of In Vitro Transcription System for Analysis of *Corynebacterium glutamicum* Promoters Recognized by Two Sigma Factors’, *Current Microbiology*, 73(3), pp. 401–408.
- Taniguchi, H. *et al.* (2017) ‘Physiological roles of sigma factor SigD in *Corynebacterium glutamicum*’, *Bmc Microbiology*, 17, p. 158.

Toyoda, K. and Inui, M. (2016) 'The extracytoplasmic function σ factor σ^C regulates expression of a branched quinol oxidation pathway in *Corynebacterium glutamicum*: The σ^C regulon in *C. glutamicum*', *Molecular Microbiology*, 100(3), pp. 486–509.

Toyoda, K. and Inui, M. (2018) 'Extracytoplasmic function sigma factor σ^D confers resistance to environmental stress by enhancing mycolate synthesis and modifying peptidoglycan structures in *Corynebacterium glutamicum*', *Molecular Microbiology*, 107(3), pp. 312–329.

Vertes, A. A., Inui, M. and Yukawa, H. (2005) 'Manipulating corynebacteria, from individual genes to chromosomes', *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp. 7633–7642.

Wade, J. T. *et al.* (2006) 'Extensive functional overlap between σ factors in *Escherichia coli*', *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(9), pp. 806–814. doi: 10.1038/nsmb1130.

Wang, Y.-Y., Xu, J.-Z. and Zhang, W.-G. (2019) 'Metabolic engineering of L-leucine production in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*: a review', *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(5), pp. 633–647.

Wendisch, V. F., Bott, M. and Eikmanns, B. J. (2006) 'Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids', *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), pp. 268–274.

Wieschalka, S., Blombach, B. and Eikmanns, B. J. (2012) 'Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), pp. 449–459.

Wieschalka, S. *et al.* (2013) 'Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*', *Microbial Biotechnology*, 6(2), pp. 87–102.

Yamaguchi, S. and Yokoe, M. (2000) 'A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp nov., a newly isolated bacterium from soil', *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), pp. 3337–3343.

Yamaguchi, S., Jeenes, D. J. and Archer, D. B. (2001) 'Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins - Purification, characterization and gene cloning', *European Journal of Biochemistry*, 268(5), pp. 1410–1421.